

1999-566489/48 B05 D13 AJIN 1997.10.29  
 AJINOMOTO KK \*JP 11246435-A  
 1997.10.29 1997-312727(+1997JP-312727) (1999.09.14) A61K  
 45/00, 31/00, 31/02, 31/195, 31/215, 31/35, 31/385, 31/66, 31/715, 38/00  
**Immuno-controlling agents - useful for preventing or treating immun-related diseases**  
**C1999-165644**  
 Addnl. Data: 1998.10.29 1998JP-308300

Immuno-controlling agents containing the substance having changing ability of reduction-type glutathione contained in macrophage cell are now.

USE

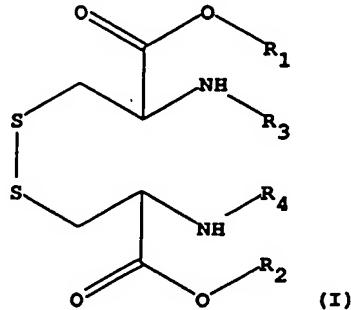
Used as preventives or treating agents at 10-500 mg/day, in the form of foods, nutritious foods containing calcium and/or vitamins, or transfusion, for immuno-related diseases such as cancer, diabetes, chronic arthritic rheumatism, or hepatitis.

PREFERRED SUBSTANCE

The substance is anti-oxidation substance such as glutathione precursors such as N-acetylcysteine, glutathione derivatives such as glutathione monoester or glutathione diester, lipoic acid and its

B(4-C1A, 7-B3, 10-B2D, 14-C6, 14-E11, 14-F9, 14-G3, 14-H1, 14-N12, 14-S4) D(3-H1T2) .10

derivatives, ortene, and flavonoid and its derivatives. The substance is a cystine derivative of formula (I), having reducing ability of reduction-type glutathione in macrophage cells:



R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = alkyl; and  
 R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> = acyl or heptidyl. (LME)  
 (20pp062DwgNo.0/4)

JP 11246435-A

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-246435

(43)公開日 平成11年(1999)9月14日

(51)Int.Cl.<sup>\*</sup>  
A 61 K 45/00  
31/00      譲別記号  
              6 0 1  
              6 0 3  
              6 1 1

F I  
A 61 K 45/00  
31/00      6 0 1 K  
              6 0 1  
              6 0 3 N  
              6 1 1

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 20 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10-308300

(22)出願日 平成10年(1998)10月29日

(31)優先権主張番号 特願平9-312727

(32)優先日 平9(1997)10月29日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 000000066  
味の素株式会社  
東京都中央区京橋1丁目15番1号  
(72)発明者 羽室 淳爾  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社中央研究所内  
(72)発明者 村田 幸恵  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社中央研究所内  
(74)代理人 弁理士 石田 康昌 (外1名)

(54)【発明の名称】 免疫調整剤

(57)【要約】 (修正有)

【課題】ヒトの免疫性疾患の改善、治療、予防のため経口摂取が可能でマクロファージや単球等の酸化、還元状態を制御し得る斬新な方法を提供する。

【解決手段】マクロファージの還元型グルタチオン量を変化させる作用を有する物質を含有させることによりヒトの免疫性疾患の治療、改善、予防を目的とした経口摂取ができる免疫調整剤。特に、シスチン誘導体を免疫抑制剤として使用することができ、肝硬変、肝炎、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病等）等ヒトの消化管炎症を中心とする炎症性疾患等の治療、改善、予防のために期待できる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】マクロファージ細胞内の還元型グルタチオン量を変化させる作用を有する物質を含有することを特徴とする免疫調整剤。

【請求項2】当該物質が、マクロファージ細胞内の還元型グルタチオン量を増加させることでインターロイキン12の産生を惹起するものである請求項1に記載の免疫調整剤。

【請求項3】当該物質が、N-アセチルシステイン(NAC)等のグルタチオンの前駆体、グルタチオンモノエステル及びグルタチオンジエステル等のグルタチオン誘導体、リポ酸(LIPOIC ACID)及びその誘導体、オルテン(ORTENE)、並びにフラボノイド及びその誘導体等の抗酸化物質から選択される少なくとも1種を含むものである請求項1に記載の免疫調整剤。

【請求項4】請求項1に記載の免疫調整剤と組み合わせてなるβ(1-3)グルカン及びサイトカインから選択

される少なくとも1種を含む免疫調整剤。

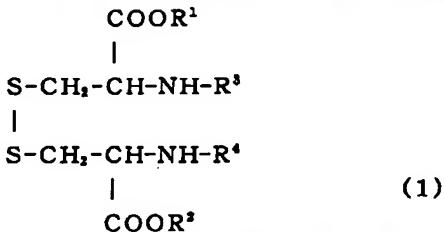
【請求項5】細胞内の還元型グルタチオン量に差のある酸化型マクロファージ及び還元型マクロファージの2種のマクロファージの何れか一方を選択的に除去し得る物質を含有することを特徴とする免疫調整剤。

【請求項6】当該物質が、細胞毒性を有するDNAアルキル化剤にグルタチオンを共役させた物質又は前駆体としてマクロファージに取り込まれた後に細胞毒性を示す物質である請求項5に記載の免疫調整剤。

【請求項7】当該物質がマクロファージ細胞内の還元型グルタチオン量を減少させる物質であり、免疫抑制剤である請求項1に記載の免疫調整剤。

【請求項8】当該物質がシスチン誘導体で、マクロファージ細胞内の還元型グルタチオン量を減少させる作用を有する誘導体である請求項7記載の免疫調整剤。

【請求項9】シスチン誘導体が下記構造式(1)で示される化合物である請求項8に記載の免疫調整剤。



但し、上記式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>はそれぞれ独立してい、アルキル基を、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>はそれぞれ独立してい、アシル基及びペプチジル基の何れかを、それぞれ表す。

【請求項10】癌患者の悪液質状態の改善、糖尿病、消化管炎症、慢性関節リウマチ、肝炎／肝硬変、過敏性肺臓炎、肺線維症及び自己免疫性炎症性疾患の何れかを対象薬効とするに適した請求項7～9何れかに記載の免疫調整剤。

【請求項11】請求項1～10何れかに記載の免疫調整剤を含有することを特徴とする食品、栄養剤又は輸液製剤。

【請求項12】癌患者の悪液質状態の改善、糖尿病、消化管炎症、慢性関節リウマチ、肝炎／肝硬変、過敏性肺臓炎、肺線維症、自己免疫性炎症性疾患及び／又は癌の化学予防を目的としたものである請求項1～9何れかに記載の免疫調整剤又は請求項11に記載の食品、栄養剤又は輸液製剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規免疫調整剤、詳しくはマクロファージ(以下、Mφと略することもある。)や、単球等の機能の斬新な制御作用を含み、特に、ヒトの免疫性疾患である肝硬変、肝炎、糖尿病、炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎、クローン病等)等の消化管炎症、過敏性肺臓炎、肺線維症、慢性関節リウマチ、喘息、皮膚アトピー症等の自己免疫疾患、アレルギー性疾

患、癌等の治療、改善、予防を目的とした経口摂取可能な免疫調整剤(例えば、免疫増強剤、免疫抑制剤。)、及びこれを含む医薬品並びに食品(医療用食品、健康食品、特定保健食品等を含む。)、栄養剤及び輸液製剤等に関する。

## 【0002】

【従来の技術】免疫系は、ウイルス、細菌等の外部からの感染、又は自己由来細胞が異常を来たすことで生成する細胞(癌細胞等)による生体侵襲から自己を防衛するためのシステムである。しかしながら、この免疫系が異常を来たし、過剰に働いたり、自己成分を排除する方向に免疫系が働いたりすると伴に、逆に、排除機能が不全状態に陥ることがある。このような状態を惹起する疾患は総称して免疫性疾患と呼ばれる。例えばアトピー性皮膚炎、花粉症、喘息、ザルコイドーシス等の急性並びに慢性炎症性疾患、アレルギー性疾患、慢性関節リウマチ、糖尿病(IDDM)、SLE、慢性疲労性症候群等の自己免疫疾患や、肝炎、肝硬変、潰瘍性大腸炎、クローン病等炎症性腸疾患(IBD)、癌悪液質状態等多くの疾患が含まれる。これら免疫性疾患の原因は様々であるが、サイトカイン、炎症性メディエーターの局所での产生を介して、特定の細胞の増殖、分化、壞死を伴う炎症を引き起こすことを発端として全身性の免疫不全、機能不全状態に至る。

【0003】免疫を担当する細胞としてはTリンパ球、Bリンパ球が良く知られ、各々細胞性免疫、液性免疫の

担い手として多彩な機能を発揮する。一方、マクロファージ／単球等は細胞性免疫及び液性免疫に深く関与する細胞で、アレルギー、リウマチ等の免疫性疾患、癌、細菌感染等の非自己である異物排除に深く関わっている。

マクロファージ／単球等の機能は、分泌機能、抗原呈示を中心とした免疫調節機能、異物、老廃物の処理、食食機能、標的細胞の障害処理機能の4種に大別され、TNF、IL-12、IL-1、IL-6、TGF $\beta$ 、IL-8等のサイトカイン、ネオプロテリン(NPT)、ジハイドロキシエピアンドロステン(DHEA)等のホルモン様分子、PGE2やLTB4等のアラキドン酸代謝産物、C5a、C3等の補体系分子、活性酸素、活性窒素等炎症像を規定する種々の分子を産生することが知られている。これらの多彩な機能が单一のマクロファージ／単球等によって担われているのか、機能を異にするマクロファージ／単球等集団によって担われているのかは不明であり、リンパ球がその細胞表面マーカーによって分類されその機能との対応が明確になっているのに対し、マクロファージ／単球等の機能の多様性と細胞亞集団の対応については全く不明である。このため、上述のような炎症性、アレルギー性、免疫性疾患の発症と病態進展に、マクロファージ／単球等は極めて重要な役割を有しているにも拘らず、マクロファージ／単球等の細胞亞集団の存在を想定しての機能分類のヒトの疾患の治療、改善、予防への応用は全く為されておらず、想定されたことすらなかった。

【0004】近年、アレルギー疾患、慢性関節リウマチ等の自己免疫性疾患や悪性腫瘍患者において、末梢血中のヘルパーT細胞亞集団のタイプの片寄りが疾患と対応づけられつつあり、Tリンパ球中の亞集団であるヘルパーTリンパ球が更に2つの亞集団Th1とTh2に分類され、その2種の存在比が生体の免疫機能の重要な指標になることが立証されつつある。本指標を基に疾患の病態を診断したり、その存在比を改善することにより、より適切な治療法を樹立しようとの試みがなされつつある。即ち、B細胞からのIgE産生を引き起こすTh2がTh1より多い場合(Th1 < Th2)、アレルギー性疾患が悪化することが分かってきており、Th1/Th2を測定することにより、免疫の状態を検定したり、Th1 > Th2にすることによりアレルギーを抑制しようとすると試みがなされつつある。逆に、Th1が支配的な状況で引き起こされる疾患の存在も慢性関節リウマチや慢性期の喘息炎症を始め、次々に指摘されつつある。

#### 【0005】

【本発明が解決しようとする課題】生物材料を用いてTh1とTh2のバランスを測定し、Tリンパ球を標的にこの2つの亞集団の機能を調節しようとしても、局所慢性炎症やアレルギー性疾患の検定、診断に利用することには、現在のところ成功していない。最近、Th1病やTh2病という言葉も用いられるが、必ずしも2者に明

確に区別できないのが実態である。

【0006】Th1/Th2の存在比は、リンパ球亞集団の指標でしかなく、リンパ球亞集団の生体内での動態は本発明で取り扱うマクロファージを始めとするアクセソリー細胞と呼ばれる細胞群の機能と実際には複雑に関わっているため、Th1/Th2の存在比だけで疾患の病態を適切に診断し、その情報を基に治療することは困難である。後述するが、マクロファージ／単球等の機能状態によってTh1/Th2のバランスは制御されているのである。治療のためにTh1 > Th2に傾斜させることを意図しても、それだけでは複雑なサイトカインネットワークにおいては効果が得難く、新たな診断、治療のための指標が待ち望まれている。

【0007】炎症反応に深く関与しているマクロファージにおいて、酸化ストレス、サイトカイン刺激、ウイルス、細菌感染等の環境因子により細胞の機能が変化することが判明しているが、その機能とマクロファージの細胞亞集団分類の対応については全く不明である。それら機能、分類において新たな知見が必要であり、それらの知見が得られることにより、飛躍的に有用な新たな治療方法の開発に繋がる。以上の状況下に、免疫を調整する優れた薬剤、即ち免疫調整剤の開発が望まれる。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、前記課題解決に向けて鋭意検討した結果、次の知見を得た。即ち、免疫抑制、悪液質誘導、癌細胞の悪性化誘導作用、炎症の遷延化作用の強いマクロファージ(単球、クップラー細胞及び樹状細胞等を含む)と、免疫調整性のマクロファージとの区別を、マクロファージのレドックス状態(ポテンシャル)の相違から試み、それを可能とした。その指標としてはマクロファージ細胞内の還元型グルタチオン(GSH)含量を採用する。

【0009】グルタチオンは、ほ乳類のあらゆる細胞に存在し、内因性の抗酸化物質として良く知られ、細胞内においてラジカルや過酸化物の除去、プロスタグランдин等のエイコサノイドの代謝、生体異物の解毒、アミノ酸輸送等多様な機能を有しているトリペプチドである。還元型(GSH)と酸化型(GSSG)が存在し、両者間で共役サイクルを形成する。通常の細胞では、GSHの濃度は還元状態の方が圧倒的に多く、酸化ストレス、特にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に対して防御的に作用する。

【0010】既に、Rude等は、GM-CSFにより分化したマクロファージと、M-CSFにより分化したマクロファージでは、細胞内GSH濃度は前者の方が高濃度であることから、細胞内GSH濃度の相違がマクロファージの機能に関与している可能性を報告(German, T., Mattner, F., Partenheimer, A., et al.:

Different accessory function for Th1 cells of bone marrow derived macrophages cultured in granulocyte macrophage colony-stimulating

factor or macrophage colony stimulating factor. Int. Immunol., 4:755, 1992; Frosch, S.,

Bonifas, U., Eck, H.-P., et al.: The efficient bovine insulin presentation capacity of bone marrow-derived macrophages activated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor correlates with a high level of intracellular reducing thiols. Eur. J. Immunol., 23: 43

0, 1993)しているが、本発明者等は、マクロファージ中の還元型GSH含量を測定するとともに、GSH含量を異にするマクロファージの免疫機能に及ぼす効果に大きな差のあること(図1参照。)、本測定法で生体の免疫能を検定しその酸化還元状態を経口投与可能な低分子物質で人為的に調整できること、及び本法が疾患の治療に広範に応用できること並びに食品として活用できることを見出し(図1参照。)、本発明を完成するに至った。

【0011】図1は、本発明により見出された知見に基づき、マクロファージ又は单球、クップラー細胞及び樹状細胞等(本発明ではこれらを併せてマクロファージと称する。)の機能の相違、並びに、Th1及びTh2バランスに及ぼす効果、更にはマクロファージの機能の相違によって引き起こされる免疫抑制、悪疫質状態、癌細胞の悪性化誘導の機序、局所炎症等との関係の模式図を示したもので、例えば、担癌進行に従い、局所のTh1/Th2バランスが崩れ、液性免疫に傾き、サイトカインレセプター複合体構成と機能が変化し、GSH含量の少ない酸化型マクロファージが増加し、活性酸素や、PGE2、IL-6、IL-10、IL-8等の炎症伝達因子の産生が高まり、全身性の免疫抑制、悪疫質状態となるとともにアレルギー状態や臓器障害を随伴する慢性炎症が遷延化する。

【0012】本発明者等は上記知見に基づき、更に研究を重ねた結果、炎症反応に重要な役割を果たしているマクロファージ細胞中の酸化型グルタチオンと還元型グルタチオンの含量を検定することにより、不均一なマクロファージ集団が2つのタイプ即ち酸化型マクロファージと還元型マクロファージとに分類することができ、酸化型マクロファージが免疫疾患に伴う局所慢性炎症やアレルギー反応を引き起こし、液性免疫と細胞性免疫のバランスに関与するTh1/Th2バランスはマクロファージの酸化/還元状態によって制御されていること、当該マクロファージの酸化還元状態が免疫性疾患の病態に重要な役割を果たしており当該酸化還元状態を検定し、その状態を人為的に制御、修飾することにより当該疾患の診断及び治療に役立つこと、しかもその制御が経口摂取可能な低分子物質によって簡便に行えることを見出した。

【0013】本発明での酸化型マクロファージ及び還元型マクロファージの定義は、還元型グルタチオン(GS

H)に特異的な化学試薬モノクロロバイメイン(MONOCHLOROBIMANE)と反応させることで細胞内GSH量を定量し、無刺激のマクロファージに比較してGSH含量が増加しているものを還元型マクロファージ、逆に含量の低下しているものを酸化型マクロファージとするものである。更に、経口摂取可能な低分子物質をマクロファージと2~24時間接触させることで、GSH含量が $2\text{ nmoles}/5 \times 10^6$ マクロファージ細胞以上のものを還元型マクロファージ(又は单球等)、 $0.1\text{ nmoles}/5 \times 10^6$ マクロファージ細胞以下のものを酸化型マクロファージとすることが好みしい。或いは、無刺激のマクロファージのGSH含量に比較してGSH量が2倍以上になっているのを還元型マクロファージ、1/5以下になっているものを酸化型マクロファージとすることもできる。

【0014】現在、Th1/Th2バランスはIL-6若しくはIL-4と、IL-12が生体内でどのような割合で産生されるかによって規定されるとされている。前2者によって液性免疫に関与するTh2が、IL-12によってTh1が誘導されることが既に知られている。しかしながら、IL-6、IL-12はマクロファージから産生されることは判明しているが、同一のマクロファージ細胞がIL-6もIL-12も産生すると仮定すると、Th1誘導にもTh2誘導にも関与する1種のマクロファージが存在することとなり、生体の免疫応答を考えるに当たり大きな矛盾にぶつかる。

【0015】本発明者等はGSH含量の高い還元型マクロファージによってのみIL-12が産生されTh1誘導に働き、酸化型マクロファージによってはIL-6の産生が亢進し、Th2が誘導されることを見出した。また、Th1サイトカインの代表であるIFN $\gamma$ が産生されてもマクロファージが酸化型に傾斜していると、IFN $\gamma$ の作用でTh2を誘導するIL-6が大量に産生されることも見出された。逆に、還元型マクロファージが存在するとTh1サイトカインの代表であるIFN $\gamma$ によってマクロファージの還元型形質が一層増強されることも判明した。酸化型マクロファージが誘導されているところにTh2サイトカインの代表であるIL-4が作用すると酸化型マクロファージの形質がさらに増強される。これらの知見は液性免疫と細胞性免疫という対局にある免疫応答がマクロファージの酸化還元状態によって一義的に規定されていることを示すもので、免疫学の根幹に関わる重要な知見である(図2参照)。この知見により免疫系疾患の病態診断と治療法について、従来の混沌とした免疫性疾患治療法に代わる頗る有用で独創的な発明を既に完成しており、この発明に基づき鋭意検討した結果、新しく本発明を完成するに至った。

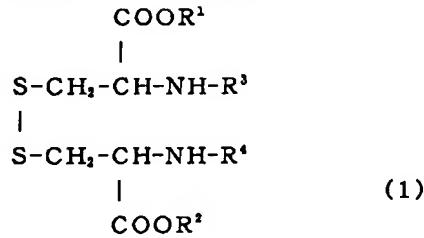
【0016】即ち本発明は、マクロファージの細胞内の還元型グルタチオン量を変化させる作用を有する物質を含有することに特徴を有する免疫調整剤である。本発明

においてはマクロファージには単球、クップファー細胞及び樹状細胞等も含まれられる。当該物質としては、マクロファージの細胞内の還元型グルタチオン量を増加させることでインターロイキン12の産生を惹起するものが好ましく、例えばN-アセチルシステイン(NAC)、アーグルタミルシステインジエチルエステル等の細胞内でGSHに代謝されるGSHの前駆体、グルタチオンモノエステル及びグルタチオンジエステル等のグルタチオン誘導体、リポ酸(LIPOIC ACID)及びその誘導体、オルテン(ORTEENE)等の低分子物質がより好ましく、経口投与又は経皮投与が可能である。ラボノイド及びその誘導体等の抗酸化物質のうち、マクロファージと接触させることでGSH含量を上げ、IL-12産生を上げ、IL-6の産生を下げるものを用いることも可能である。また、これらと併用される物質として、例えばβ(1-3)グルカン、サイトカイン等の高分子物質は、静脈内投与、DDS(ドラッグデリバリー・システム)等を用いての投与において好ましい。当該サイトカインとしては、例えばIL-4、IL-2、IL-12、TGFβ、IFNγ等のサイトカインが好ましく、細胞性免疫を増強したい場合にはIL-2及び/又はIFNγが特に好ましく、細胞性免疫を減弱したい場合にはIL-4及び/又はTGFβが特に好ましい。これらの物質は1又は2以上含有することが可能であり、低分子の経口可能な免疫調製剤と高分子の静脈投与に適した免疫調製剤を併用することでより高い効果が期待される。

【0017】また、本発明には、細胞内の還元型グルタチオン量に差のある酸化型マクロファージ及び還元型マクロファージの2種マクロファージの何れか一方を選択的に除去し得る物質を含有することを特徴とする免疫調整剤も含まれる。当該物質としては、例えば、細胞毒性を有するDNAアルキル化剤をグルタチオンと共に作用させ

た物質、酸化型又は還元型マクロファージ特異的抗体とマクロファージに細胞毒性を有する低分子化合物並びにマクロファージに取り込まれた後に細胞毒性を示す物質とを直接又はリンカーを介して結合させた物質等がある。当該アルキル化剤としては、例えばサイクロフォスファミド、ニムスチン(ACNU)、マイトマイシンC、メルファン等がある。アルキル化剤とグルタチオンとを直接又はリンカーを介して共有結合させることにより、グルタチオンS-トランスフェレース酵素が活性化されている酸化型マクロファージでは、当該酵素の働きによりDNAアルキル化剤が遊離し、酸化型マクロファージを特異的に殺傷することにより除去することができる。また、インビトロでは、殺細胞性が無いものの酸化型又は還元型の何れかのマクロファージ中で増大している酵素の作用により、殺細胞性を示すようになる物質をプロドラッグとして用いることもできる。

【0018】本発明者等は前記知見に基づき更に研究を消化管炎症に特化し、マクロファージ細胞内の還元型グルタチオン量を減少させる物質を探査し、極めて低投与量でその効果を発揮する物質を見出し、ヒトの消化管炎症に類似する動物モデルを作製し、医薬品としての免疫抑制剤、医療用食品、健康食品、特定保健食品等に用いる免疫抑制作用を有する食品、栄養剤及び輸液製剤の開発に研究深化发展させ、その物質としてシスチン誘導体に着目し、特に下記の構造式(1)で示される化合物を用いて、試験管内の免疫活性の抑制効果、動物投与下における免疫抑制効果を広く検定し、更には自発的に消化管炎症を発症する遺伝子ノックアウトマウスを用いて候補物質の薬効を検討し、マクロファージ及び単球等の細胞内の還元型グルタチオン量を減少させる作用を有する薬理物質として、シスチン誘導体、特に下記構造式(1)で示されるシスチン誘導体が有効であることを見出した。



但し、上記式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>はそれぞれ独立していて、アルキル基を、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>はそれぞれ独立していて、アシル基及びペプチジル基の何れかを、それぞれ表す。特に、潰瘍性大腸炎、クローン病等の炎症性腸疾患、肝炎／肝硬変等の消化管炎症の疾患に対する免疫抑制剤として極めて有効である。

【0019】更に、本発明には、前記免疫調整剤としての医薬品を含むが、前記免疫調整剤を含有する食品(医療用食品、健康食品、特定保健食品等を含む。)、栄養剤又は輸液製剤も含まれる。食品としては、通常の食品

や、歯磨きやチューインガム等口の中に運ばれるものも含まれ、特に健康志向の食品に含有されるのが好ましい。また、食品に添加する添加剤の形で用いられてもよい。栄養剤としては、例えばビタミン剤、カルシウム剤等の何れの栄養剤でもよい。輸液製剤としては、例えば高カロリー輸液、生理食塩水、血液製剤等の通常用いられる輸液製剤に含有することができる。

【0020】また、本発明の免疫調整剤、食品、栄養剤又は輸液製剤は、特に癌患者の悪液質状態の改善、糖尿病、消化管炎症、慢性関節リウマチ、肝炎／肝硬変、前

記自己免疫性炎症性疾患及び／又は癌の化学予防を目的として用いられるのが好ましい。

【0021】特に、ヒトマクロファージ細胞内の還元型グルタチオン量を減少させる作用を有する免疫調整剤の場合には、特に単独若しくは混合物として広く前記自己免疫性炎症性疾患等の免疫抑制剤として医薬用途に限らず、前記食品等に使用でき、免疫抑制作用を有する食品並びに栄養剤、輸液製剤としても有用性を発揮する。

【0022】更に詳細に述べると、本発明は次の通りである。ヒトから分離・採取した体液／細胞試料を用いて、マクロファージ細胞内の酸化型及び／又は還元型グルタチオン量を検定することにより、マクロファージをそれぞれ異なる機能を有する酸化型マクロファージと還元型マクロファージとに分類し、その存在割合を経口摂取できる物質で人為的に制御したり、片方の（酸化型若しくは還元型の）マクロファージを人為的に除去することでヒトの免疫関連疾患患者の治療に有用な免疫調整剤や病態改善に役に立つ食品、栄養剤、輸液を提供することである。ヒトからの分離・採取した体液／細胞試料とは、例えば末梢血や腹腔、胸腔、固形癌局所組織、関節腔、各種臓器より分離した細胞である。

【0023】グルタチオンの測定方法としては、直接的に酵素リサイクリング法で生化学的に酸化型又は還元型グルタチオン含量を測定する（活性酵素実験プロトコール（細胞工学別冊）、秀潤社、頁84-88、1994年、ANALYTICAL CHEMISTRY, VOL. 106, PP207-212, 1980; CELLULAR IMMUNOLOGY, VOL. 164, PP73-80, 1995等参照。）のみならず、間接的な測定、例えば酸化型又は還元型マクロファージに対する特異的なモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いて測定したり、モノクロロバイメインのようにGSHに特異的に反応し、錯体を形成し、レーザー光励起により蛍光を発するような試薬を用いればよい。

#### 【0024】

【発明の実施の形態】本発明の実施の形態を説明する。本発明におけるグルタチオンとは、別名5-L-グルタミル-L-システィニルグリシンであり、生体内に最も多く存在するSH化合物で、一般にGSHと記述される。グルタチオンは、その分子の酸化状態により還元型グルタチオンと酸化型グルタチオンに分類される。還元型グルタチオンとは、前記のグルタチオン（GSH）のことであり、酸化型グルタチオンは、別名グルタチオンジスルフィドと呼ばれるもので、GSSGと記述される。

【0025】本発明におけるマクロファージには、前述の通り単球も含まれる。同時に、樹状細胞やクップファーネ細胞と呼ばれるマクロファージの類縁細胞も含まれる。マクロファージは、様々なサイトカインや炎症性メディエーター等の情報伝達物質をその細胞から遊離、放出することが知られているが、その活性化状態、分化状

態により、放出されるか否か、また放出される量が異なる。本発明によれば、例えばマクロファージ細胞内の酸化型グルタチオンと還元型グルタチオンとの量に着目し、酸化型マクロファージと還元型マクロファージに分類後免疫状態を確認して、本発明の免疫調整剤等により、これらマクロファージのバランスを調整することにより、生体内の免疫状態を改善し、様々な疾患の治療や予防に役立てられる。

【0026】還元型マクロファージでは、細胞内の還元型グルタチオンが酸化型マクロファージより相対的に多いのに対して、酸化型マクロファージでは、還元型グルタチオンが還元型より相対的に少ない。また、還元型マクロファージと酸化型マクロファージでは、還元型GSH含量の違いのために転写制御因子の活性化に違いが生じ、サイトカインや炎症伝達因子の遺伝子発現に違いが起こり、產生される炎症性サイトカインや炎症性メディエーターの種類や量が変化し、炎症の質が変化する。

【0027】酸化型マクロファージでは、IL-6, IL-1, IL-8, IL-10, TNF, 過酸化水素、スーパーオキシド、PGE2等の炎症性サイトカイン及びメディエータが產生されるのに対して、還元型マクロファージでは、一酸化窒素（NO）、IL-12、LTB4等が產生される。更に、酸化型マクロファージ及び還元型マクロファージは、刺激等により変換する。例えば、炎症や敗血症性ショックを誘導するLPSやPMAや、IL-4、TGF $\beta$ 等のサイトカインにより人為的に刺激することにより、還元型マクロファージは酸化型に変換され、逆に、IFN $\gamma$ 、IL-2、抗腫瘍性多糖であるレンチナン（LNT）やリボ酸等の抗酸化剤を添加することにより、酸化型マクロファージを還元型に変換することができる。このことにより、免疫性疾患等の治療に応用することができる。

【0028】病態により酸化型マクロファージ及び還元型マクロファージの量は異なる。アレルギー性疾患患者や末期癌患者から採取した体液又は細胞試料中に含まれる酸化型マクロファージは、健常人より相対的に多い。このことを利用することにより、免疫性疾患、癌性悪液質の診断のための検定、それに引き続く治療に用いることができる。

【0029】また、消化管炎症疾患モデル動物（肝炎、クローン病、潰瘍性大腸炎）より採取したマクロファージ中の還元型グルタチオン量は、正常動物より相対的に減少していることが、Adherent cell analysing system（ACAS）を用いる画像解析や酵素リサイクリング法を用いる生化学的定量により判明した。このことは炎症性腸疾患や消化管炎症においてマクロファージは酸化型に傾斜していることを示し、発症若しくは病態進展への防御機構の何れかに酸化型マクロファージが関与することを示す。発症に関与する場合には、還元型に変換することが必要であり、病態進展への防御機構を担うものとし

て酸化型マクロファージが関与する場合には、薬剤の投与によりマクロファージの酸化型状態を持続することを意図する必要がある。本発明者等はこの二つの可能性の何れが病態の本質であるかを鋭意検討した結果、消化管を中心とした慢性炎症、自己免疫性臓器炎症において酸化型マクロファージは炎症病態進展への防御機構を担うものとして機能することを世界で初めて見出し、これら消化管の病態改善、治療の手段としてマクロファージ中の還元型グルタチオン量を減少させることが有益であることを見出したものである。

【0030】本発明に従えば、マクロファージの細胞内の還元型グルタチオン量を上記方法で測定した後に、当該マクロファージの細胞内の還元型グルタチオン量を変化させる作用を有する低分子化合物で経口摂取でも活性が保持されるものを医薬品として通常の製剤化を行い、病態をモニターしつつ連日若しくは一定の期間をあけ患者に摂取せねば良い。慢性期においては長期間の服用継続により効果が著明となる。

【0031】本発明での酸化型マクロファージ及び還元型マクロファージの定義は、還元型グルタチオン（GSH）に特異的な化学試薬モノクロロバイメインと反応させることで細胞内GSH量を定量し、無刺激のマクロファージに比較してGSH含量が増加しているものを還元型マクロファージ、逆に含量の低下しているものを酸化型マクロファージとするものである。更に、経口摂取可能な低分子物質をマクロファージと2~24時間接触させることで、GSH含量が $2\text{ nmol es}/5 \times 10^5$ マクロファージ細胞以上のものを還元型マクロファージ、 $0.1\text{ nmol es}/5 \times 10^5$ マクロファージ細胞以下のものを酸化型マクロファージとすることが好ましい。或いは、無刺激のマクロファージのGSH含量に比較してGSH量が2倍以上になっているのを還元型マクロファージ、1/5以下になっているのを酸化型マクロファージとすることもできる。

【0032】マクロファージの細胞内の還元型グルタチオン量を変化させる作用を有する物質としては、マクロファージ（又は単球等）を96穴マイクロプレートで、 $5 \times 10^5$ 細胞/ $200\mu\text{l}$ /穴宛培養し、被験物質を $0.01\mu\text{M} \sim 5\text{ mM}$ 添加し、 $37^\circ\text{C}$ で5%CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養し、2~24時間後に対照群に対し還元型GSH量を増加又は減少せるものならば何れも用いることができる。 $2\text{ nmol es}/5 \times 10^5$ マクロファージ細胞以上に増加させる物質又は $0.1\text{ nmol es}/5 \times 10^5$ マクロファージ細胞以下に減少させることもできるものが望ましい。これらの物質として、例えばN-アセチルシステイン（NAC）、 $\gamma$ -グルタミルシステインジエチルエステル等の細胞内でGSHに代謝されるGSHの前駆体、グルタチオンモノエステル及びグルタチオンジエステル等のグルタチオン誘導体、リポ酸（LIPOMIC ACID）及びその誘導

体、オルテン（ORTENE）等、並びにラボノイド及びその誘導体等の抗酸化物質等の低分子物質で、インピトロでマクロファージと数時間培養して細胞内のグルタチオン量を変化させる作用を有する物質を挙げることができる。これらの薬剤は単独若しくはそれらの混合物として用いることができる。その効果は摂取若しくは投与後炎症局所や末梢血から単核球を採取し、前述の方法で細胞内還元型グルタチオン量の治療前に対する変化を検定することで判定できる。このことで免疫調整剤としての有用性は明確に判定され、疾患に対して効果を有する。シスチン誘導体について、特に免疫抑制剤として使用する場合にも上記免疫調整剤に含まれ、勿論上記同様に実施することができる。

【0033】対象として用いることのできる疾患としては、癌患者の悪液質状態の改善、糖尿病、慢性関節リウマチ、SLE、肺線維症等の自己免疫疾患、肝炎／肝硬変、炎症性腸疾患等の消化管炎症を中心とする炎症性疾患、過敏性肺臓炎、喘息、皮膚アトピー、ザルコイドシス等のアレルギー性疾患等が挙げられる。

【0034】特に、免疫抑制剤を適用可能な疾患としては、自己免疫性の炎症性疾患であれば効果が期待される。なかなか肝炎／肝硬変、潰瘍性大腸炎、クローン病等炎症性腸疾患と呼称される疾患群を含む消化管に生じる慢性炎症性疾患に免疫抑制剤として適用することが望ましい。

【0035】Th1/Th2バランスの異常やマクロファージの機能不全等が関連する疾患であれば広範に適用することができる。癌の化学予防等にも免疫調整剤として有効であることは、一個の正常細胞が個体の中で発癌、癌化した後に臨床的に発見される $10^9$ 個になるまでの間、生体が還元状態に存在することの有益なことは明らかである。即ち、生体内の炎症で産生される活性酸素等が癌化の進展に寄与していることは科学的に証明されているからである。

【0036】本発明で取扱う免疫調整剤は実際の医療現場では単独で投与することもできるが、本発明に含まれる経口摂取可能な免疫調整剤同士、若しくは、経口摂取不可能であるが異なる作用機転でマクロファージの細胞内の還元型グルタチオン量を変化させる他の免疫調整剤、例えばレンチナンを代表とする $\beta(1-3)$ グルカンや、インターロイキン2（IL-2）を代表とするサイトカイン等生体外由来並びに生体内由来の物質と混合若しくは併用することもできる。特に、細胞性免疫を増強したい場合にはIL-2と併用したり、 $\gamma$ インターフエロン（ $\gamma$ IFN）と併用すると還元型マクロファージより大量にインターロイキン12（IL-12）が生体内で産生され本発明の効果を一層増強する。逆に、細胞性免疫を減弱することで治療効果を意図する場合にはインターロイキン4（IL-4）やTGF $\beta$ と併用するとIL-12の産生が減弱し効果を増強する。これらサイ

トカインはそれ自体がマクロファージの細胞内の還元型グルタチオン量を変化させることも本発明の過程で見出され、本発明の有用性とその範囲を補強するものである。

【0037】生体外由来の物質としては抗体以外にもIL-1<sub>2</sub>の産生や機能を阻害する物質であれば併用することにより更なる相乗効果が期待される。

【0038】細胞内の還元型グルタチオン量に差のある、即ち、還元型GSH含量の低いマクロファージ（酸化型マクロファージ）、若しくは高いマクロファージ（還元型マクロファージ）の何れか一方を選択的に除去することも本発明に含まれる。その際に用いられる物質は低分子化合物、高分子化合物の何れでも良く、中でも抗体及びその誘導体は効率的である。

【0039】既に述べた通り、マクロファージ／単球等の機能の多様性と細胞亜集団の対応については今まで全く不明であった。このため、炎症性、アレルギー性、免疫性疾患の発症と病態進展に、マクロファージ／単球等は極めて重要な役割を有しているにも拘らず、マクロファージ／単球等細胞亜集団の存在を想定しての機能分類のヒトの疾患の治療、改善、予防への応用は全く為されておらず、想定されたことすら無かった。本発明完成の前段階として、マクロファージの還元型GSH含量を測定するとともに、世界で始めて、GSH含量を異にするマクロファージの免疫機能に及ぼす効果に大きな差があることを見出し、炎症反応に重要な役割を果たしているマクロファージ細胞中の酸化型グルタチオンと還元型グルタチオンの含量を検定することにより、不均一なマクロファージ集団が2つのタイプ即ち酸化型マクロファージと還元型マクロファージとに分類され、酸化型マクロファージが免疫疾患に伴う局所慢性炎症やアレルギー反応を引き起こし、液性免疫と細胞性免疫のバランスに関与するTh1/Th2バランスはマクロファージの酸化／還元状態によって制御されていること、当該マクロファージの酸化還元状態が免疫性疾患の病態に重要な役割を果たしていることが見出された。この2種のマクロファージの存在割合を人為的に制御するには前述の経口摂取可能な低分子物質を医薬品として用いる以外に、何れか片方のマクロファージを選択的に除去することも頗る有用な方法である。このことはリンパ球に対する各種モノクローナル抗体が免疫抑制剤として上市されている事実からも明らかである。片方のマクロファージにのみ若しくは多量に発現されているマーカーに対する抗体を用いればよいことは当該業者には容易に想定できるところである。

【0040】また、細胞に対して毒性を有する物質やその誘導体を用いることができるが、還元型マクロファージと酸化型マクロファージの間には細胞内の各種酵素活性に大きな違いがあるのでプロドラッグの形のもので還元型マクロファージ若しくは酸化型マクロファージの何

れかの細胞内で選択的に細胞毒性を有する物質に交換できるもの等は、本発明に最も叶う。酸化型マクロファージ内で活性が上昇するビリミジンヌクレオチドホスホリース酵素活性やグルタチオン-S-トランスフェラース酵素活性の活用等がその例であり、細胞毒性を有するアルキル化剤にグルタチオンを共役させたもの等がある。

【0041】本発明の免疫調整剤は広範な免疫性疾患に適用できることは、マクロファージからの炎症性伝達因子の分泌を基本的なところで制御することから明白である。例えば、非ステロイド性酸性抗炎症剤（アスピリン等）は、プロスタグランジン産生、遊離を抑制することでその薬効を発揮するといわれる。一方、ビタミンE等の抗氧化剤は活性酸素の産生を抑制することで薬効を発揮する等、その作用が図1に示す炎症性細胞たるマクロファージの多彩な機能の1局面を制御するのみである。そのため、その効果も著明ではなく、特に慢性炎症には効果は殆ど認められない。それに対して本発明になる免疫調整剤はマクロファージの酸化／還元状態を制御することを基本とするもので、有害な炎症伝達因子の産生を一度に多数抑制できるものである。従来の薬物の概念を基本から変革するものといえる。

【0042】以上のように、本発明の免疫調整剤の医療現場における有用な薬効は、その有用な免疫活性からして自明であり、疾患の急性期、慢性期の何れにも有用である。特に、癌患者の悪液質状態の改善、糖尿病、慢性関節リウマチ、SLE、肺線維症等の自己免疫疾患、肝炎／肝硬変、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クロhn病等）を中心とする消化管炎症等の慢性炎症性疾患、過敏性肺膜炎、喘息、皮膚アトピー、ザルコイドーシス等のアレルギー性疾患等Th1/Th2バランスの異常やマクロファージの機能不全、異常が関連する疾患であれば広範に適用することができる。癌の化学的予防等にも免疫調整剤として有効である。癌患者の悪液質状態の改善については、延命効果が期待されるとともに特にQOLの改善にも大いに有益と考えられる。

【0043】以下に、特に本発明の免疫調整剤をシステム誘導体について免疫抑制剤として使用する場合について詳細に説明する。還元型グルタチオン量を減少させる作用を有する物質については前記の通りであるが、システム誘導体としては、N,N'-ジアセチルシステム、((NAC)<sub>2</sub>)、N,N'-ジプロピルシステム((NP)<sub>2</sub>)、N,N'-ジアセチルシステムジメチルエステル((NAC-OMe)<sub>2</sub>)、N,N'-ジアセチルシステムジソプロピルエステル((NAC-OiPr)<sub>2</sub>)、N,N'-ジエチララニルシステムジメチルエステル((NAIaC-OMe)<sub>2</sub>)等、前記構造式(1)に示され、マクロファージ細胞内の還元型グルタチオン量を減少させる作用を有する化合物であれば全て本発明に使用するシステム誘導体に含まれる。

【0044】この化合物の骨子としては、ジスルファイド結合によりマクロファージ細胞内の還元型グルタチオンが酸化されて酸化型マクロファージに誘導されるものであれば、R<sup>1</sup>-R<sup>2</sup>を表す置換基には、広範な範囲のものが許容される。例えば、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>はそれぞれ独立していて、炭素数1-12のアルキル基を、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>はそれぞれ独立していて、炭素数1-12のアシル基及び炭素数1-12のペプチジル基の何れかを、それぞれ表す。尚、ペプチジル基は式：RNHC-O-で示される置換基（Rは有機基を表す。）である。

【0045】これらの薬剤は単独若しくはそれらの混合物として用いることができる。その効果は摂取若しくは投与後炎症局所や末梢血から单核球を採取し、前述の方法で細胞内還元型グルタチオン量の治療前に対する変化を検定し、生体の免疫活性の変動を測定することで判定できる。このことで、特に免疫抑制剤としての有用性は明確に判定され、疾患に対して効果を有する。

【0046】投与形態としては、注射投与、経口投与等特に制限はないが、経口投与可能ということで有利である。有効成分である還元型グルタチオン量を変化させる作用を有する物質の投与量は、患者等投与対象者の症状や使用目的に応じて選択されるが、重症患者で例えば末期胃癌患者の場合1日当たり1mg～5000mg（経口剤）程度、好ましくは10～500mg程度である。製剤を製造する場合は特に困難はなく、経口剤、注射剤、経皮剤等所望の剤型において、それぞれ公知の方法を利用して製造することができる。

【0047】以上、本発明になる免疫調整剤が狭義の医薬品として如何に有用で、新規性に優れるかを説明した。本発明による免疫調整剤は経口摂取可能な物質をその主要成分とするため、その用途は、医療現場における医薬品に限られない。即ち、ヒトマクロファージ（単球、クップラー細胞及び樹状細胞等を含む。）細胞内の還元型グルタチオン量を変化させる作用を有する物質を単独若しくは混合物として含有する医療用食品、健康食品、特定保健食品等として食品（チューインガムや歯磨き等の口に入れるものは全て含まれる。）並びに栄養剤、輸液製剤の形態で提供することも可能で有り、本発明に含まれる。液体成分に含有させることも、固体の食品の形をとることも可能である。

【0048】対象としては医薬品として提供する場合と同じである。癌患者の悪液質状態の改善、糖尿病、消化管炎症、慢性関節リウマチ、肝炎／肝硬変、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）を中心とする消化管炎症、自己免疫性炎症性疾患、癌の化学予防等を対象薬効として、免疫調整作用を有する食品並びに栄養剤、輸液製剤の形態で提供することのできるものである。有効成分の使用量については、前記医薬品の場合に説明した内容に準じて行うとよい。発症、慢性化した疾患だけでなく、成人病等のハイリスクの人に予防的に摂取せざること

とを可能にする。

#### 【0049】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

#### 【0050】（実施例1）

＜酸化型マクロファージ及び還元型マクロファージの機能の検定＞

（方法）酸化型マクロファージは、LPS（リポボリサッカライド）20μgをマウス腹腔内に投与して誘導されること、還元型マクロファージはレンチナン100μgを同じく腹腔内に1日おきに3回投与することにより誘導されていることが、腹腔浸出細胞をプラスチック表面に付着させた後、モノクロロバイメイン10μMと37℃、30分間反応させ、ACASで解析することで判明した。酸化型の增量は反応産物が殆ど認められないこと、即ちネズミ色や青色の画像になること、還元型の增量は赤色や黄色の画像が得られることから肉眼的に容易に検定できる。

【0051】そこで、腹腔浸出付着細胞を以下のようにして酸化型及び還元型に誘導して産生されるNO、IL-6、PGE2を測定した。

#### （1）材料

細胞：上記のように刺激して得られた腹腔浸出付着細胞、即ちマクロファージを96穴マイクロプレートに1×10<sup>5</sup>細胞/200μl宛添加。

培地：フェノールレッドフリーのRPMI1640:200μl/穴。

LPS：リポボリサッカライド（シグマ社製）（由来：E. coli）100ng/ml。

IFNγ：100单位/ml。

#### （2）培養方法

5% CO<sub>2</sub>インキュベーター中37℃で、48時間培養。

#### （3）測定方法

上記培養終了後、培養上清を回収し、IL-6はIL-6依存性の細胞株のMH60を用いて増殖反応で、PGE2はエライザキットを用いて、NOはグリースロイミン試薬を用いて、何れも当該業者が日常に行う方法で各々の産生量を測定した。

【0052】（結果）結果を図3に示した。図3から明らかのように、酸化型マクロファージと還元型マクロファージとでは、産生する炎症性サイトカインIL-6、炎症性メディエーターPGE2、NOの産生強度、種類が異なることが明らかである。即ち、酸化型マクロファージではTh2サイトカインであるIL-6の産生と免疫抑制性でTh1誘導を抑制するPGE2産生が上昇し、NO産生は低下する。これとは対照的に還元型マクロファージからはNOの産生が上昇し、PGE2産生やIL-6産生は抑制される。両マクロファージの間に機

能的な差異が存在することが明確である。

【0053】(実施例2)

<遺伝子をノックアウトして免疫不全状態にした病態動物を用いた検定>酸化型Mφと還元型Mφにおいて、何故炎症メディエーターやサイトカインの産生に違いが生じるのかを物質レベルで解析することは、炎症の慢性化、増悪のメカニズムを解明するために重要である。一般に、外からの刺激(リガンド等)は、細胞表面上に存在する受容体(レセプター)を介して細胞内に伝達する。レセプターからの信号により、種々のキナーゼが活性化され、更に転写因子が活性化され、転写因子が核内に移行し、標的となる遺伝子に結合して発現する。最近の研究により、細胞内の酸化還元系は、転写因子の活性化、核内への移行、遺伝子との結合に関与していることが明らかとなりつつある(ANNUAL REV. IMMUNOLOGY, VOL.8, PP453-475, 1990, EMBO J., 10, 2247-2251, 1991)。

Mφにおけるレセプターを介した遺伝子発現系に、細胞内の酸化還元系がどのように関与しているかは現在のところ明らかではない。明らかにする一つの手段として、レセプターからの信号伝達系に関与する分子を欠損しているノックアウトマウスよりMφを調製し、酸化還元系の機能を解析した。具体的には、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9及びIL-15のレセプター構成分子として共通に用いられているcommon γ鎖(γc)及びその下流に存在し、γcからの信号を伝達する分子であるJak3を標的分子とした。

【0054】(サイトカイン、刺激剤)マウスIFNγには、ゲンザイム社製のリコンビナント体を用いた。ヒトIL-2及びヒトIL-6には、味の素社の作製したリコンビナント体を用いた。ヒトIL-12には、ファーミンジョン社製のリコンビナント体を用いた。LPSには、ディフコ社製のE. Coli. O55:B5由來のものを用いた。レンチナンとしては、味の素社で製造した製剤品を用いた。

【0055】(使用したマウス)γcノックアウトマウスには、東北大医学部・菅村先生より、Jak3ノックアウトマウスには、千葉大医学部・斎藤先生よりそれぞれ導入したものを用いた。交配、及び対照として用いた野生型マウスは、C.R.Jより購入したC57BL/6を用いた。

【0056】(腹腔Mφの採取)腹腔細胞の採取は、エーテルにより犠牲死させたマウスの腹腔内に、氷冷した5mlのフェノールレッドフリーのD MEM培地(日研生物社製)を22ゲージの針を付けた注射筒により注入し、しごいた後、培地を抜き取ることにより行った。

【0057】(IL-6の定量)1×10<sup>6</sup>個のMφに刺激剤を添加し、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーターにて2日間培養した。遠心後培養上清を採取した。IL-6の定量は、IL-6に依存的に増殖するマウスハイブリドーマMH60細胞を用いて行った(J.EUR. IMMUNOL., V

OL. 18, PP 951, 1988)。10%FCS含有RPMI培地で1×10<sup>5</sup>個/mlに調製したMH60細胞液100μlに、培養上清100μlを添加し、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーターにて、2日間培養した。その後、同培地にて5mg/mlの濃度に調製したMTT(シグマ社製)を10μl加え、37℃にて5時間反応させた。反応終了後遠心し、上清を160μl取り除き、塩酸-プロパノールを100μl加えて、ピペットマンで懸濁することにより細胞を溶解した。溶解後直ちに570nmの吸光度をイムノメーター(バイオラッド社製)により測定した。

【0058】(NO<sub>x</sub>-濃度の測定)1×10<sup>6</sup>個のMφに刺激剤を添加し、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーターにて2日間培養した。遠心後培養上清を採取した。

【0059】100μlの培養上清に、50mg/mlの濃度で蒸留水で調製したグリースロイミン試薬(和光純薬社製)を100μl加えて室温で15分間反応させた。反応終了後、540nmの吸光度を測定した。なお、スタンダードとして、NaNO<sub>2</sub>を用いた。

【0060】(ACASによる細胞内GSHの検出) Chambered cover glass(Nunc社製、#136439)に、RPMI1640培地(フェノールレッドフリー)にて調製した3×10<sup>5</sup>個/mlの細胞懸濁液を300μl入れ、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーターにて2時間培養した。同培地にて洗浄後、同培地にて調製した10μMのモノクロロバイメイン(Molecular probe社製)を300μl添加し、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーターに入れ、30分反応させた後、ACASにて蛍光強度を測定した。なお、ACASではUVレーザーを用いた。

【0061】(IL-12の定量)IL-12定量は、ヒトT細胞株2D6細胞を用いたバイオアッセイで行った(J.LEUKOCYTE BIOLOGY, VOL 61, PP346, 1997)。

【0062】500pg/mlのリコンビナントヒトIL-12、50μMの2-メルカプトエタノール、10%FCS(牛胎児血清)を含むRPMI1640培地にて培養しておいた2D6細胞をチューブに移し、IL-12を除いた同培地にて3回遠心洗浄し、細胞濃度を1×10<sup>5</sup>/mlに調製した。予め50μMの2-メルカプトエタノール、10%FCSを含むRPMI1640培地により系列希釈したサンプルを100μlづつ入れた96穴平底プレートに、細胞懸濁液を100μlづつ加えた。その後、37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベーターに入れ、48時間培養した。最後の6時間で、3H-TdRをパルスした(50μMの2-メルカプトエタノール、10%FCSを含むRPMI1640培地により、370kBq/mlに調製したものを50μlづつ添加)。細胞をハーベストし、βカウンター(マトリックス96;パッカード社製)で放射活性を測定した。

【0063】(ノックアウトマウスより調製したMφのGSH濃度の測定) それぞれのノックアウトマウスの腹腔細胞を調製し、MCB試薬を用いたACASにより、細胞内GSH量を解析した。対照のマウス(C57BL/6)に比べ、何れのマウスにおいても、還元型グルタチオンの量は著明に減少した。

【0064】(ノックアウトマウスより調製したMφの機能) 野生型マウス(C57BL/6)と、それぞれのノックアウトマウスより腹腔細胞を調製し、LPS、IL-2、IFN $\gamma$ 及びその組み合わせにより刺激し、NO産生、IL-6産生及びIL-12産生能を測定した。NO産生に関しては、無刺激では何れのマウスでも殆ど産生がみられないが、LPSとIFN $\gamma$ 刺激の組み合わせにおいて、rcノックアウトマウスでは、IL-2の併用添加効果が殆どみられず、対照マウスに比較してNO産生は半分以下に低下した。Jak3ノックアウトマウスについてもrcと同様の結果であった。次に、IL-6の産生能について解析した。LPS刺激では、rcノックアウトマウスで亢進がみられ(対照81pg/m1に対し96.2pg/m1)、IFN $\gamma$ 刺激では、rcノックアウトマウスで亢進がみられた。この結果は、NO産生の抑制パターンと同様であった。次に、LPS及びIFN $\gamma$ 刺激によるIL-12産生能を検討した。しかし、何れのマウスにおいても産生は全くみられなかった。このことは、ここに用いた遺伝子ノックアウトマウス病態動物は酸化型マクロファージが増量しTh2主流の液性免疫やアレルギー反応が亢進し、Th1によって担われる細胞性免疫が低下していることを示す。病態動物モデルにおいても本発明の免疫調整剤に必要な免疫系疾患の病態診断が独創的で、有意義であることを明確に示す例である。

#### 【0065】(実施例3)

<担癌末期マウスにおける還元型グルタチオン測定による検定>

(方法) 担癌末期マウス(COLON 26)及び正常マウスの腹腔から採取したマクロファージの酸化型及び還元型の検定を行った。癌悪液質の産生がよく知られているCOLON 26移植腫瘍をCDF1マウスの背部皮下に $5 \times 10^5$ 個/個体移植し、腫瘍移植後21日目になって悪液質状態となったマウスに、毎日1mg/0.5ml/hのグルタチオンエチルエステルをゾンデを用いて10日間経口投与した。そのマウスより実施例3と同様の方法で腹腔内細胞を採取し、腹腔内マクロファージを採取し $3 \times 10^6$ 個/m1になるように10%牛胎児血清含有フェノールレッドフリーのRPMI 1640培地に懸濁し、 $100\mu l$ 宛Lab-Tek Chamber Slides(NUNC社製、#136439)に添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下、3時間培養し、浮遊細胞を除去した後、血清非含有の上記培地を $200\mu l$ 添加し、次いでモノクロロバイメインを $10\mu M$ になるように添加し、30分間反応させ、ACAS装置(MERIDIEN社製)にてUV吸収を基に画像解析した。

ERIDIEN社製)にてUV吸収を基に画像解析した。

【0066】(結果) ACAS法により、還元型グルタチオンを定量した結果、正常マウスに比べ、担癌末期モデルマウスでは、還元型グルタチオン含量が減少したマクロファージ、即ち酸化型マクロファージが相対的に増量した。酸化型マクロファージが増量しているため、上記マクロファージ培養上清中のIL-6が顕著に増量していた(対照マウスの $120\text{ pg}/\text{m1}$ に対して、 $600\text{ pg}/\text{m1}$ )。また、PGE2量も対照の $7.6\text{ ng}/\text{m1}$ に対して $32\text{ ng}/\text{m1}$ と5倍以上に増量しており、担癌末期の免疫抑制状態や、悪液質状態がこれらメディエーターの過剰産生に基づくことが判明した。他に活性酸素産生の増量も認められた。数多くのパラメーターを測定しなくてもマクロファージの酸化還元状態をグルタチオンの含量を測定することで癌患者の病態、免疫機能診断等のための検定を簡便且つ的確に行うことができる。

#### 【0067】(実施例4)

<担癌末期マウスにおけるグルタチオンエチルエステルの経口投与による還元型マクロファージの誘導> COLON 26移植腫瘍をCDF1マウスの背部皮下に $5 \times 10^5$ 個/個体移植し、腫瘍移植後21日目になって悪液質状態となったマウスに、毎日1mg/0.5ml/hのグルタチオンエチルエステルをゾンデを用いて10日間経口投与した。そのマウスより実施例3と同様の方法で腹腔内細胞を採取し、腹腔内マクロファージを採取し $3 \times 10^6$ 個/m1になるように10%牛胎児血清含有フェノールレッドフリーのRPMI 1640培地に懸濁し、 $100\mu l$ 宛Lab-Tek Chamber Slides(NUNC社製、#136439)に添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下、3時間培養し、浮遊細胞を除去した後、血清非含有の上記培地を $200\mu l$ 添加し、次いでモノクロロバイメインを $10\mu M$ になるように添加し、30分間反応させ、ACAS装置(MERIDIEN社製)にてUV吸収を基に画像解析した。

【0068】(結果) ACAS法により、還元型グルタチオンを定量した結果、対照生理食塩水投与群マウスに比べ、グルタチオンエチルエステル投与の担癌末期モデルマウスでは、還元型グルタチオン含量が減少したマクロファージ、即ち酸化型マクロファージが相対的に減量した。還元型マクロファージが増量しているため、上記マクロファージ培養上清中のIL-6が顕著に減量していた(対照マウスの $5200\text{ pg}/\text{m1}$ に対して、 $642\text{ pg}/\text{m1}$ )。また、PGE2量も対照の $32\text{ ng}/\text{m1}$ に対して $6.5\text{ ng}/\text{m1}$ と著明に減量しており、担癌末期の免疫抑制状態や、悪液質状態がグルタチオン

エチルエステルの経口投与で改善できることが判明した。これに応じて、両群のマウスの平均生存日数は、対照の42日から148日に延長した。

#### 【0069】(実施例5)

<ザルコイドーシス疾患者から採取したマクロファージの検定とその酸化状態の還元状態への変換>ザルコイドーシス(類肉腫症)の疾患の患者の末梢血及び胸腔内より常法により分離・採取した単核球中に含まれるマクロファージの酸化型及び還元型マクロファージの量を酵素リサイクリング法により、還元型グルタチオン(GSH)及び酸化型グルタチオン(GSSG)の量を生化学的に測定することにより検定を行った。対照としては健常人の末梢血を用いた。

【0070】(材料) 健常人の末梢血及びザルコイドーシス患者の末梢血をヘパリン採血或は患者の気管支に経気管支鏡(BRONCHOFIBER)的に150mlの生理食塩水を注入し、75mlを回収して、何れもフィコールハイパーク(LYMPHOPREP)で分離精製した単核球を10%牛胎児血清含有RPMI1640倍地に懸濁し、3回洗浄後、ガラスシヤーレに30分間付着させたマクロファージ/単球画分を用いた。この後、5mMのN-アセチルシステイン(NAC)を添加して3時間培養する群及び培地成分のみの群を調製した。シヤーレからの分離にはラバーポリースマンを用いた。5×10<sup>6</sup>個のマクロファージについて以下のように検定を実施した。

【0071】(方法) 還元型と酸化型のグルタチオンの測定は前述の酵素リサイクリング法によった。

【0072】(サンプル調製) PBSにて洗浄した細胞のペレットに、冷やした5mMEDTAを含む0.1Mリン酸バッファー、pH7.5により調製したTritylone-X-100を100μl添加し、5分間室温に放置して細胞を溶解した。0.1MのHClを15μl添加し、更に50% sulfosalicylic acid(SSA)溶液を15μl添加して混合後、12,000rpmで5分間遠心して上清を採取し[\*]、総グルタチオン濃度(GSH+GSSG)の測定サンプルとした。

【0073】(測定法) 0.5mMEDTAを含む10mMリン酸バッファー、pH7.5を590μl、6u/mIの濃度に同バッファーで調製したグルタチオニリダクターゼ(ベーリンガーマンハイム社製)を100μl、5%NaHCO<sub>3</sub>にて調製した4mMのNADPH(シグマ社製)を50μl、サンプルを10μl加えて、37°Cにて5分間インキュベートし、5mMEDTAを含む0.1Mリン酸バッファー、pH7.5により調製した10mMの5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB;シグマ社製)溶液を50μl加えて、37°Cにおける412nmの吸光度の経時的变化を分光光度計により

測定した。なお、標準サンプルとして、GSH(シグマ社製)をサンプルと同じ調製法で調製して用いた。別途、酸化型グルタチオン(GSSG)量のみを測定し—上記\*印の後に、2μlの2-ビニルピリジン(東京化成社製)を添加し、室温で1分間混和しpHを7.5に調製後、室温に60分間放置し、測定サンプルとし、同様に測定する—総グルタチオン量より差し引くことで還元型グルタチオン(GSH)量を求めた。

【0074】(結果) 患者の末梢血中の還元型と酸化型グルタチオンの量はGSSG 5.29μM、GSH 20.45μMと還元型GSHが還元型が約80%で、依然として優位であるが(健常人においては90%以上が還元型GSHである)、胸腔内マクロファージでは還元型GSHが1.45μMであり、酸化型GSSGが15.85μMと酸化型が約86%とその存在比が完全に逆転することが判明した。NAC添加群においては、還元型GSHが20.45μMであり、酸化型GSSGが4.32μMと酸化型が急激に減少し、還元型の比率が80%を越え、末梢血レベルに回復した。このことは、本疾患において酸化型マクロファージが病態形成に大きな位置を占めること、その病態がNAC投与で改善できることを示し、本発明の有用性が明らかである。

#### 【0075】(実施例6)

< NAC、GSH-OEt 経口投与による還元型マクロファージの誘導>レセプターからの信号伝達系に関与する分子を欠損しているノックアウトマウスよりMφを調製し、酸化還元系の機能を解析した。具体的には、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9及びIL-15のレセプター構成分子として共通に用いられているcomm onγ鎖(γc)及びその下流に存在し、γcからの信号を伝達する分子であるJAK3を標的分子とした。実施例2と同様の方法で実施した。JAK3ノックアウトマウスを3群に分類し対照群としては通常の水道水の自由摂取群、NAC群としては1mg/mIのNACを溶解した水道水の自由摂取群、GSH-OEt群としては1mg/mIのGSH-OEtを溶解した水道水の自由摂取群とし、SPF条件下での飼育を24日間継続し、そこで腹腔浸出付着細胞、即ちマクロファージを同様に得た。

【0076】(サイトカイン、刺激剤) マウスIFNγには、ゲンザイム社製のリコンビナント体を用いた。ヒトIL-2及びヒトIL-6には、味の素社の作製したリコンビナント体を用いた。ヒトIL-12には、ファーミングジエン社製のリコンビナント体を用いた。

【0077】LPSには、ディフコ社製のE.Coli O55:B5由来のものを用いた。レンチナンとしては、味の素社で製造した製剤品を用いた。

(IL-6の定量)

(NO<sub>2</sub>-濃度の測定)

(ACASによる細胞内GSHの検出)

(IL-12の定量)これらは全て実施例2に準じて実施された。

【0078】(ノックアウトマウスより調製したMφのGSH濃度の測定)それぞれの処置を受けたノックアウトマウスの腹腔細胞を調製し、MCB試薬を用いたACASにより、細胞内GSH量を解析した。対照のマウス(水道水自由飲水群)に比べ、NAC、GSH-OEt溶解水道水自由飲水群の何れのマウスにおいても、還元型グルタチオンの量は著明に増加し、正常マウスにNAC腹腔内投与で誘導される還元型Mφの画像を示した。

【0079】(ノックアウトマウス処置の各群より調製したMφの機能)3群、それぞれのノックアウトマウスより腹腔細胞を調製し、LPS、IL-2、IFNγ及びその組み合わせにより刺激し、NO産生、IL-6産生及びIL-12産生能を測定した。NO産生に関しては、無刺激では何れのマウスでも殆ど産生がみられない。次に、IL-6の産生能について解析した。LPS刺激では、ノックアウトマウスで962pg/ml、NAC群で122pg/ml、GSH-OEt群で82pg/mlとなり、還元型に変換できることが機能面からも確認された。IL-6がTh2を誘導する主たるサイトカインであることを考えると、これらの物質の経口摂取で生体のTh1/Th2バランスを制御できることを明確に示す。この結果は、NO産生の抑制と薬物による回復パターンと逆相関した。次に、LPS及びIFNγ刺激によるIL-12産生能を検討した。対照群においては産生は全くみられなかった。このことは、ここに用いたJAK3遺伝子ノックアウトマウス病態動物は酸化型マクロファージが増量しTh2主流の液性免疫やアレルギー反応が亢進し、Th1によって担われる細胞性免疫が低下していることを示す。一方、NAC、GSH-OEt投与群では各々、420pg/ml、610pg/mlのIL-12産生が認められた。病態動物モデルにおいても本発明が免疫系疾患の病態改善に有用な免疫調整剤として独創的で、有意義であることを明確に示す例である。

#### 【0080】(実施例7)

<還元型、酸化型マクロファージからのIL-12産生の差異>T細胞の分化過程、選択過程、機能発現過程に異常があると、生体の免疫系が破綻することから、免疫系の中心的役割は、T細胞により担われていると考えられる。T細胞の亜集団の一つであるヘルパーT細胞(Th)は、リンホカインを産生することにより、免疫担当細胞や炎症性細胞を制御している細胞であるが、最近、Thは、産生するリンホカインの種類により、更にTh1とTh2の2種類に分けられ、それぞれが異なる免疫機能を担っているという考えが提唱されている(J. IMMUNOL., VOL. 136, PP 2348. 1986)。即ち、Th1は、IL-2やIFNγを産生し、細胞性免疫の調節の主体であり、Th2はIL-4、IL-5、IL-

6やIL-10を産生し、液性免疫の調節の主体であり、生体内の免疫調節の恒常性は、Th1とTh2のバランスにより保たれているとする考え方である。通常は、Th1/Th2バランスがどちらかに傾くと、それを是正することにより恒常性が維持されるが、何らかの原因によりバランスが是正されない状態が持続すると免疫病が発症すると考えられている。Th1とTh2は、Th0という段階からそれぞれに分化するが、Th0からTh1への分化にはMφの産生するIL-12が重要であり(IMMUNOLOGY TODAY, VOL.335, PP 14, 1993)、Th0からTh2への分化にはNKT細胞が産生するIL-4が重要である(J. EXP. MEDICINE, VOL.179, PP 1285, 1994)。

【0081】前述の実施例でMφのレドックス状態の相違によりMφ機能が異なることが明らかである。Mφには、GSH量の相違から酸化型Mφと還元型Mφの2種類のMφが存在し、NOやIL-6産生パターンが異なる。Th0からTh1への分化を誘導し、Th1/Th2バランス制御の鍵の分子であるIL-12の主な産生細胞はMφと考えられるが、その詳細な解析はこれまで報告されていない。IL-12の産生は、酸化型Mφと還元型Mφで異なるのか否かは、免疫病の発症メカニズムの観点からも興味深い点である。本発明者等は、IL-12が還元型Mφからのみ産生することを見いだすとともに、IL-12と同じくTh1/Th2バランス制御を行っていると考えられているIL-4が、酸化型Mφ、還元型Mφに作用し、Th2側へシフトさせていることを見出した。本発明の完成に先立って得られた知見を基に、Mφのレドックス状態が、Th1/Th2バランスを制御していることを示し、本発明を使用する上で免疫系疾患の病態診断に如何に有用かを説明する。

【0082】(IL-12は還元型Mφから産生される)実施例1において、レンチナン(LNT)を腹腔内注射して調製したMφは、GSH量の高い還元型であり、LPSを腹腔内注射して調製したMφは、GSH量の低い酸化型であることを示した。LNT誘導MφとLPS誘導Mφにおいて、IL-12産生能が異なるか否かを検討した。LPSとIFNγの刺激により、LNT誘導Mφでは著明なIL-12産生(1312pg/ml)がみられたが、LPS誘導Mφ及び対照のレジデントMφでは産生がみられなかった(図4)。次に、細胞内GSH量を変化させる物質を腹腔内注射して調製したMφを用いて同様の解析を行った。細胞内GSH量を増加させる物質であるGSH-OEt、低下させる物質であるDEMをそれぞれ投与し調製したMφでは、GSH-OEt投与マウス由来Mφでのみ、LPSとIFNγ刺激によりIL-12が産生された(3570pg/ml)。これらの結果は、細胞内のGSH量の多い還元型Mφでのみ、IL-12が産生されることを示す。

【0083】(還元型MφからのIL-12産生は、細

胞内GSH量を低下させることにより抑制される)細胞内のGSH量の多い還元型Mφでのみ、IL-12が產生されることを示したが、この產生は、Mφを酸化型にすることにより抑制されるか否かを検討した。即ち、レンチナン誘導Mφを、DEM刺激することにより、IL-12の產生が抑制されるか否かを解析した。その結果、レンチナン誘導MφからのIL-12產生(828 pg/m1)は、DEMを添加することにより、完全に抑制される(0 pg/m1)ことが明らかとなった。即ち、DEM処理により細胞内の還元型グルタチオンを枯渇させ、還元型Mφを酸化型Mφへと変換することにより、IL-12產生は抑制されることが示唆された。

【0084】(IL-4は、還元型MφからのIL-12產生を抑制する)IL-4は、Mφに作用し、抑制的に働くとされているサイトカインである。IL-4は、Th1/Th2バランスの制御においても、IL-12と相対する作用を有していると考えられている。そこで、IL-4が、還元型MφからのIL-12產生に対し、抑制的に作用するか否かを検討した。LNT誘導MφからのIL-12產生及びGSH投与マウス由来MφからのIL-12產生ともに、IL-4で前処理することによりは著明に抑制することが明らかとなった(各々1580 pg/m1より370 pg/m1へ、490 pg/m1より258 pg/m1へ)。即ち、IL-4はMφに作用し、IL-12產生を抑制することにより、Th1/Th2バランスをTh2側にシフトしている可能性が示唆された。この際、IL-4はMφ中の還元型グルタチオン量を著明に減少させることがACASによる画像解析で判明した。

【0085】(IL-4は、NO產生を抑制し、IL-6產生を亢進する)還元型Mφは、酸化型Mφに比較してIFNγ刺激でのNO產生が亢進し、逆にIL-6產生は抑制される。IFNγは、Th1細胞から產生されるサイトカインとして知られており、IL-4がIFNγによるNO產生及びIL-6產生に対し、どのような作用を示すか、それぞれのMφを用いて解析した。IL-4で前処理したMφ(レジデント、LPS誘導、LNT誘導)にIFNγを作用させ、NO產生量を測定したところ、IL-4で処理していないMφに比較して、IL-4処理したMφからのNO產生は有意に抑制された。また、GSH-OEt刺激により細胞内GSH量を増加させたMφ及びDEM刺激により細胞内GSH量を低下させたMφをIL-4で前処理後、IFNγとLPSを作用させてNO產生量を測定したところ、IL-4未処理に比較して、著明にNO產生が抑制された。

【0086】一方、IL-6產生は、レジデントMφ、LPS誘導Mφ、LNT誘導Mφ何れともIL-4により前処理することにより、IFNγでの產生が著しく亢進した。更に、GSH-OEt刺激により細胞内GSH量を増加させたMφ及びDEM刺激により細胞内GSH

量を低下させたMφをIL-4で前処理後、IFNγを作用させてIL-6產生量を測定したところ、IL-4未処理に比較して、著明にIL-6產生が亢進された。これらの結果より、IL-4は、細胞内還元型グルタチオン量を減少させることにより、酸化型マクロファージを誘導し、IFNγ刺激によるNO產生を抑制し、IL-6產生を亢進することが明らかとなった。このことは、IL-4はIFNγの作用、即ちTh1型の作用と考えられるNO產生を抑制し、本来IFNγは弱い作用であったIL-6產生誘導を亢進させ、Th2型の作用を増強させる活性を有していることを示すものである。本研究は本発明になる免疫調整剤の有用性を科学的に証明するものである。

#### 【0087】(実施例8)

<経口摂取NACとIL-2の併用によるIL-12產生の増強>DBA/2♀の8週令のマウスに実施例6同様の方法で水道水を自由飲水させる群とNAC 1 mg/m1濃度の水道水を自由飲水させる2群を作り、更に各々の群にヒトリコンビナントIL-2:2 μg/0.5 ml/hを1日2回隔日に2週間腹腔内投与を併用する群を設定した。14日目に実施例6同様にMφからのIL-12產生量を検定した。

【0088】(調製したMφのGSH濃度の測定)それぞれの処置を受けたマウスの腹腔細胞を調製し、MCB試薬を用いたACASにより、細胞内GSH量を解析した。対照のマウス(水道水自由飲水群)に比べ、NAC溶解水道水自由飲水群及びIL-2投与群において、還元型グルタチオンの量は著明に増加し、還元型Mφの画像を示した。NAC溶解水道水自由飲水にIL-2投与を併用する群においては何れの単独群よりも還元型グルタチオンの量は更に増加し、還元型Mφの誘導における併用効果がACAS画像解析で明瞭に認められた。併用群では、全てのMφ中に還元型グルタチオンの量の増加が認められた(単独処置群の增量が40-50%のMφに認められることと対照的である)。

【0089】(各群より調製したMφの機能)4群、それぞれのマウスより腹腔細胞を調製し、LPS+IFNγにより刺激し、NO產生、IL-6產生、及びIL-12產生能を測定した。単独投与、併用群の3群何れも対照群に対して還元型マクロファージが増量しているため、上記マクロファージ培養上清中のIL-6量が減少した(対照マウスの1240 pg/m1に対して、NAC溶解水道水自由飲水群320 pg/m1、IL-2投与群520 pg/m1、NAC溶解水道水自由飲水にIL-2投与を併用する群67 pg/m1)。IL-6がTh2を誘導する主たるサイトカインであること考えると、これらのNAC経口摂取にIL-2なるサイトカインの注射による併用で生体のTh1/Th2バランスがより強力に制御できることを明確に示す。NO產生の増強パターンはIL-6產生と逆相關した。IL-12

産生については、対照マウスの $0\text{ pg}/\text{ml}$ に対して、NAC溶解水道水自由飲水群 $620\text{ pg}/\text{ml}$ 、IL-2投与群 $946\text{ pg}/\text{ml}$ 、NAC溶解水道水自由飲水にIL-2投与を併用する群 $2386\text{ pg}/\text{ml}$ と著明な併用効果が認められた。本発明が、サイトカイン類との併用で、免疫系疾患の著しい病態改善に有益な免疫調整剤として独創的で、有意義であること示す。

#### 【0090】(実施例9)

<(NAC-OMe)<sub>2</sub>、(NAC)<sub>2</sub>投与による酸化型マクロファージの誘導>酸化型マクロファージは(NAC-OMe)<sub>2</sub>若しくは(NAC)<sub>2</sub>  $20\mu\text{g}/0.5\text{ml}/\text{h}$ をd1、d2にマウス腹腔内に投与して誘導されること、還元型マクロファージはNAC  $2\text{ mg}/0.5\text{ml}/\text{h}$ を同じく腹腔内にd1、d2投与することにより誘導されていることが、投与終了後20時間後に腹腔浸出細胞を採取し、プラスチック表面に付着させた後、モノクロロバイメイン $10\mu\text{M}$ と $37^\circ\text{C}$ 、30分間反応させ、ACASで解析することで判明した。酸化型の増量はモノクロロバイメインとの反応産物が殆ど認められないこと、即ちネズミ色や青色の画像になること、還元型の増量は赤色や黄色の画像が得られることから肉眼的に容易に検定できる。免疫抑制作用の良く知られるステロイド剤の代表であるデキサメサゾン $40\mu\text{g}/0.1\text{ml}/\text{h}$ をマウス背部皮下にd1、d2に投与して20時間後に誘導されるマクロファージは殆どネズミ色の画像になること、即ち酸化型マクロファージが強力に誘導されることが判明した。一方、N-アセチルシステイン(NAC)  $2\text{ mg}$ 投与後20時間目の腹腔浸出細胞を採取して同様に検定したところ赤色や黄色の画像が得られ還元型マクロファージが誘導されることが確認された。

試料	(対対照群産生量%)		
	NO産生	IL-6産生	IL-12産生
(NAC-OMe) <sub>2</sub>	12	320	11
(NAC) <sub>2</sub>	18	340	15
NAC	172	42	920
デキサメサゾン	45	1020	5

【0095】表1から明らかなように、(NAC-OMe)<sub>2</sub>、(NAC)<sub>2</sub>投与により誘導された酸化型マクロファージでは、産生される炎症性サイトカインIL-6、NO、IL-12の産生量が変動することが明らかである。即ち、薬剤投与で得られた酸化型マクロファージではIL-6の産生は増強され、臓器障害性に働くNO産生も細胞性免疫を増強するIL-12産生も低下する。この効果は典型的免疫抑制剤であるステロイドのデキサメサゾンより強いか同等である。これと対照的にN-アセチルシステイン(NAC)により誘導される還元型マクロファージからはNOの産生、IL-12の産生が上昇し、IL-6産生は抑制される。

【0091】<(NAC-OMe)<sub>2</sub>、(NAC)<sub>2</sub>投与によって誘導されたマクロファージからのNO、IL-6産生>そこで、腹腔浸出付着細胞を以下のように培養し、培養上清に産生されるNO、IL-12を測定した。IL-6産生量は刺激剤不在下の自発産生量を測定した。

#### 【0092】(1) 材料

細胞：上記のように刺激して得られた腹腔浸出付着細胞即ちマクロファージを $96$ 穴マイクロプレートに $1\times 10^5$ 細胞/ $200\mu\text{l}$ 宛添加

培地：フェノールレッドフリーのRPMI1640  $200\mu\text{l}/\text{穴}$

LPS：リポボリサッカライド（シグマ社製）（由来：*E.coli*)  $100\text{ ng}/\text{ml}$

IFN $\gamma$ ： $100$ 単位/ $\text{ml}$

#### 【0093】(2) 測定方法

(腹腔Mφの採取)腹腔細胞の採取は、エーテルにより犠牲死させたマウスの腹腔内に、氷冷した $5\text{ ml}$ のフェノールレッドフリーのD MEM培地（日研生物社製）を $22$ ゲージの針をつけた注射筒により注入し、しごいた後、培地を抜き取ることにより行った。

(IL-6の定量)実施例2の場合と同様に定量した。

(NO<sub>x</sub>-濃度の測定)実施例2の場合と同様に測定した。

(ACASによる細胞内GSHの検出)実施例2の場合と同様に検出した。

(IL-12の定量)実施例2の場合と同様に定量した。

(結果)マクロファージからのNO、IL-6、IL-12産生の抑制効果についての結果を表1に示す。

#### 【0094】表1

#### 【0096】(実施例10)

<卵白アルブミン抗原に対する遲延型過敏症反応の抑制効果>(NAC-OMe)<sub>2</sub>、(NAC)<sub>2</sub>、NAC、デキサメサゾンを実施例9と同様にd1からd5まで連日投与、抗原として卵白アルブミンとコンプリートH37Raアジュバント(DIFC 0)1:1懸濁液 $100\mu\text{l}$ （含む $250\mu\text{g}$ 卵白アルブミン）を感作抗原としてd2に背部皮下に投与、惹起抗原としてd8に左耳に皮下投与し24時間の左耳の腫脹厚を右耳と比較した。

【0097】卵白アルブミン抗原に対する遲延型過敏症反応の抑制効果についての結果は表2に示す通りであ

り、 $(NAC-OMe)_2$ 、 $(NAC)_2$ 投与によって卵白アルブミン抗原に対する遅延型過敏症反応は著明に抑制された。このことはこれらの物質の投与により細胞性免疫が抑制されたことを示す。

【0098】表2

試料	耳厚の増分(mm)
対照群	15.1
$(NAC-OMe)_2$	9.75
$(NAC)_2$	9.88
NAC	16.5
デキサメサゾン	4.75

【0099】(実施例11)

<遺伝子をノックアウトしてマクロファージを酸化状態にした動物のマクロファージの機能>酸化型Mφと還元型Mφにおいて、何故炎症メディエーターやサイトカインの產生に違いが生じるのかを物質レベルで解析することは、炎症の慢性化、増悪のメカニズムを解明するためには、外からの刺激(リガンド等)は、細胞表面上に存在する受容体(レセプター)を介して細胞内に伝達する。レセプターからの信号により、種々のキナーゼが活性化され、更に転写因子が活性化され、転写因子が核内に移行し、標的となる遺伝子に結合して発現する。最近の研究により、細胞内の酸化還元系は、転写因子の活性化、核内への移行、遺伝子との結合に関与していることが明らかとなりつつある(ANNUAL REV. IMMUNOLOGY, VOL.8, PP453-475, 1990; EMBO J., 10, 2247-2251, 1991等参照。)。Mφにおけるレセプターを介した遺伝子発現系に、細胞内の酸化還元系がどのように関与しているかは現在のところ明らかではない。明らかにする一つの手段として、レセプターからの信号伝達系に関与する分子を欠損しているノックアウトマウスよりMφを調製し、酸化還元系の機能を解析した。具体的には、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、及びIL-15のレセプター構成分子として共通に用いられているcommonγ鎖( $\gamma c$ )を標的分子とした。

【0100】(サイトカイン、刺激剤)マウスIFN $\gamma$ は、ゲンザイム社製のリコンビナント体を用いた。ヒトIL-2、及びヒトIL-6は、味の素社の作成したリコンビナント体を用いた。ヒトIL-12は、ファーミンジョン社製のリコンビナント体を用いた。LPSは、ディフコ社製のE.Coli.055:B5由来のものを用いた。レンチナンは味の素(株)製造の製剤品を用いた。

【0101】(使用したマウス) $\gamma c$ ノックアウトマウスは、東北大医学部・菅村先生より導入したもの用いた。交配、及び対照として用いた野生型マウスは、C.R.Jより購入したC57BL/6を用いた。

【0102】(ノックアウトマウスより調製したMφのGSH濃度の測定) $\gamma c$ ノックアウトマウスの腹腔細胞

を調製し、MCA試薬を用いたACASにより、細胞内GSH量を解析した。対照のマウス(C57BL/6)に比べ、 $\gamma c$ ノックアウトマウス由来のマクロファージ細胞内の還元型グルタチオンの量は著明に減少した。

【0103】(ノックアウトマウスより調製したMφの機能)野生型マウス(C57BL/6)、 $\gamma c$ ノックアウトマウスより腹腔細胞を調製し、LPS、IL-2、IFN $\gamma$ 、及びその組み合わせにより刺激し、NO产生、IL-6产生、及びIL-12产生能を測定した。NO产生に関しては、無刺激では何れのマウスでも殆ど产生がみられないが、LPSとIFN $\gamma$ 刺激組み合わせにおいて、 $\gamma c$ ノックアウトマウスでは、対照マウスに比較してNO产生は半分以下に低下した。次に、IL-6の产生能について解析した。LPS刺激では、 $\gamma c$ ノックアウトマウスで亢進が見られ(対照81pg/mlに対し962pg/ml)、IFN $\gamma$ 刺激では、 $\gamma c$ ノックアウトマウスで亢進が見られた。次に、LPS及びIFN $\gamma$ 刺激によるIL-12产生能を検討した。しかし、何れのマウスにおいても产生は全く見られなかつた。このことは、ここに用いた遺伝子ノックアウトマウス病態動物は酸化型マクロファージが増量しTH2主流の液性免疫やアレルギー反応が亢進し、TH1によって担われる細胞性免疫が低下していることを示す。病態動物モデルにおいても本発明が免疫系疾患の病態診断に独創的で、有意義であることを明確に示す例である。

【0104】(実施例12)

< $\gamma c$ ノックアウトマウスにおける消化管炎症の自然発症>正常マウスや $\gamma c$ ノックアウトマウスの野性型(遺伝子形質+/+, +/Y)においては通常のSPF飼育条件下では消化管炎症は全く見られない。ところが、 $\gamma c$ ノックアウトマウス(遺伝子形質-/-, -/+、-/-Y)においては消化管炎症が高頻発し、-/-、-/-Yというホモノックアウトマウスにおいては4ヶ月以内に約70%が、+/-においても6ヶ月以内に約60%が消化管炎症を自然発症する。即ち、腸管短縮、血便、下痢、軟便、脱肛、大腸肥厚等が認められる。

【0105】腸管炎症モデルとしてはデキストラン硫酸の経口摂取が良く知られているが、人の消化管炎症には $\gamma c$ ノックアウトマウスの炎症像が遙かに良く類似する。病理標本を用いての組織化学的解析では以下のような事実が明らかとなった。人消化管炎症モデルの病理標本の解析；肛門から2-3cm部分の結腸に対応する大腸のホルマリン固定HE染色標本について実施した。標本の評価を1)炎症の縦方向への広がり、粘膜上皮-粘膜固有層-粘膜筋板-粘膜下層-内輪筋層-外縦筋層-糞膜方向への浸潤2)横方向への広がり3)浸潤細胞の種類4)血管新生の程度5)粘膜下層の肥厚の5点を中心に実施した。 $\gamma c$ ノックアウトマウスの野性型である+/-の正常標本には炎症性細胞の浸潤は殆ど認められず、粘膜構造は杯細胞、粘膜上皮細胞とも良好に保持する。本野性型+/-

YマウスにDS1%飲料水自由飲水群では、腺腔内への好中球、炎症性細胞の脱落が見られ、杯細胞の変性、消失(degeneration)、粘膜上皮の化生と変性が高度に認められた。リンパ球、Mφ、好中球の高度浸潤、血管新生、血管拡張も高度に起こっていた。グレード4の炎症と判定した。

【0106】*rcノックアウトマウス*-/-の無処置マウス標本では、粘膜上皮はintactに近いが、増生が見られ炎症性細胞の腺腔内への脱落ではなく、粘膜下層にも浮腫はなく、筋層、粘膜下層への浸潤はない。粘膜固有層にのみMφ、リンパ球の浸潤があり、DS誘発モデルと異なり好中球の浸潤は見られなかった。単なる急性炎症像とは異なり、人の炎症性腸疾患像に近い。

【0107】*rcノックアウトマウス*-/Yの無処置マウス標本では、粘膜上皮が野性型の2-3倍になっており粘膜固有層にのみ炎症性細胞の浸潤が限局クラスターとして存在。クラスターに接する粘膜*rcノックアウトマウス*+/-の無処置マウス標本は、-/-,-/Yのものに比較して正常に近い。炎症性細胞の浸潤クラスターが粘膜固有層底部に軽度に認められるのみである。

【0108】以上より、人の炎症性腸疾患に類似するのは*rcノックアウトマウス*-/-,-/Yマウスであり、DS誘発モデルは*rcノックアウトマウス*自然発症モデルとは機序が異なると考えられる。

#### 【0109】(実施例13)

<*rcノックアウトマウス*における消化管炎症の自然発症の抑制効果>上記知見に基づいて、人クローン病、潰瘍性大腸炎モデルに関し、*rcノックアウトマウス*における消化管炎症の自然発症の抑制効果を検定した。酸化型Mφに傾斜する*rcノックアウトマウス*<sup>+/Y</sup>と-/-Y各6匹に生食若しくは(NAC-OMe)<sub>2</sub>若しくは(NAC)<sub>2</sub>:20μg/hを週2回計5回投与投与し、-/-Yにおける消化管炎症自然発症を抑制するか否かを検討。*-/-Y非投与群*、投与群で投与開始後14日目において、(NAC-OMe)<sub>2</sub>の場合、発症率は83%対25%、31日目において、発症率83%対25%、生存率33%対100%、45日目で発症率100%対25%、生存率33%対75%となり、(NAC)<sub>2</sub>の場合各々、30,40,100,40,75%となり、本発明に使用する物質が消化管炎症自然発症マウスにおいて、明確な延命効果及び発症予防効果を有することが認められた。尚、+/-Yマウスの投与非投与群では発症は見られず差はない。

#### 【0110】(実施例14)

<*rcノックアウトマウス*におけるデキストラン硫酸誘発消化管の抑制効果>*rcノックアウトマウス*+/-3ヶ月令マウスについて、(NAC-OMe)<sub>2</sub>:20μg/hを週3回2週間投与、16日目にDS1%自由飲水を開始。30日目における消化管炎症発症率は非投与群100%投与群16.6%と本薬剤の効果が認められた。また、生存率は非投与群57%に対して投与群100%と著明な効果が認められ

た。*+/+マウス*でも投与群対非投与群で発症率は60%たい80%と効果の傾向を認めた。尚、*rcノックアウトマウス*及びその野性型♂<sup>+/Y</sup>、-/-Y、♀<sup>+/+</sup>、+/-、-/-に消化管炎症モデルとしてデキストラン硫酸を1%濃度に飲料水に溶解し、自由飲水させた。雌の方が抵抗性であり、抵抗性は-/-Y、+/-Y、雄では-/-、+/-、+/-の順であることが判明した。デキストラン硫酸投与開始後の生存率は13日目において80.0,100,100%となり、デキストラン硫酸誘発消化管炎症に酸化型Mφ主流のマウスの方が抵抗性があることを示しており、本発明の妥当性を間接的に支持するものである。

#### 【0111】

【発明の効果】本発明の免疫調整剤により、マクロファージ(单球、クップファー細胞及び樹状細胞等を含む。)の機能の斬新な制御が可能となり、特にヒトの免疫性疾患である肝硬変、肝炎、糖尿病、消化管炎症、慢性関節リウマチ、喘息、皮膚アトピー症等の自己免疫疾患、アレルギー性疾患、癌等の治療、改善、予防を可能とする。

【0112】免疫調整剤のうち免疫抑制剤、特にシスチン誘導体を使用することにより、マクロファージ、单球等の機能の斬新な制御が可能となり、特に、ヒトの炎症性疾患である肝硬変、肝炎、潰瘍性大腸炎、クローン病等の炎症性腸疾患を中心とする消化管炎症等の治療、改善、予防を目的とした免疫抑制剤から成る医薬品並びに食品、栄養剤、輸液製剤を提供することができる。特に、経口摂取ができる、医薬品並びに食品、栄養剤及び輸液製剤として使用可能である。

#### 【図面の簡単な説明】

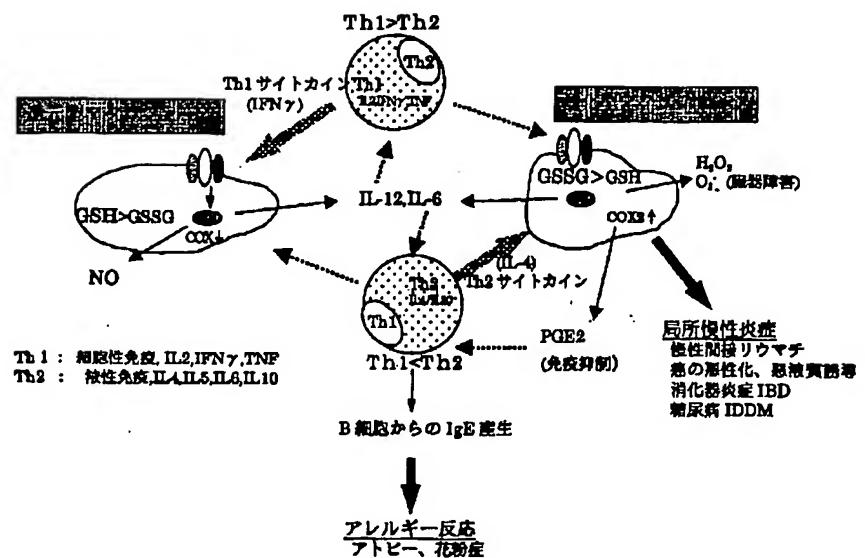
【図1】図1は、想定される、マクロファージの機能の相違並びにTh1及びTh2による免疫抑制、悪性腫瘍状態、癌細胞の悪性化誘導の機序、局所炎症等との関係の模式図を示す。

【図2】図2は、酸化型、還元型マクロファージの存在比がTh1型、Th2型サイトカインの選択的な産生制御を介して免疫機能を制御していることを説明したものである。本発明者等の新しい知見に基づくものであり、マクロファージの酸化還元状態がin vivoにおける免疫能の傾きを増幅する要になっていることを示す。

【図3】図3は、実施例1における両マクロファージの機能の検定の結果を表す図で、酸化型マクロファージ及び還元型マクロファージにおける機能の差を示したグラフである。

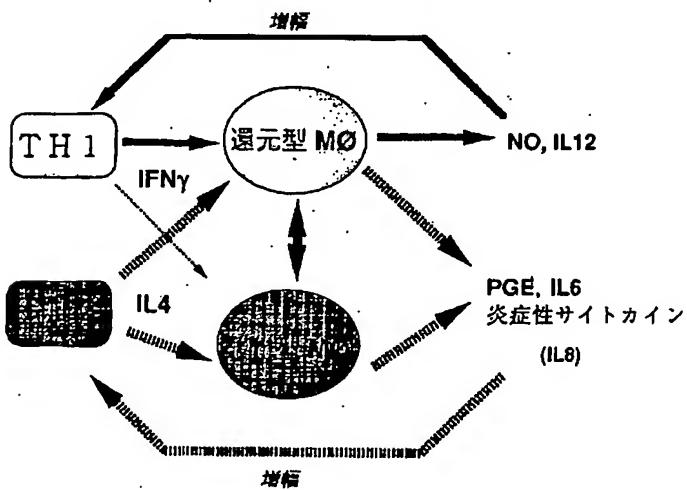
【図4】図4は、LNT誘導MφとLPS誘導Mφにおいて、IL-12産生能が異なるか否かを検討した結果を表す図で、酸化型、還元型マクロファージによってTh1サイトカインであるIL-12の産生量が全く異なり、IL-12は還元型グルタチオン含量の高い還元型マクロファージからのみ産生されることを示す。

【図1】



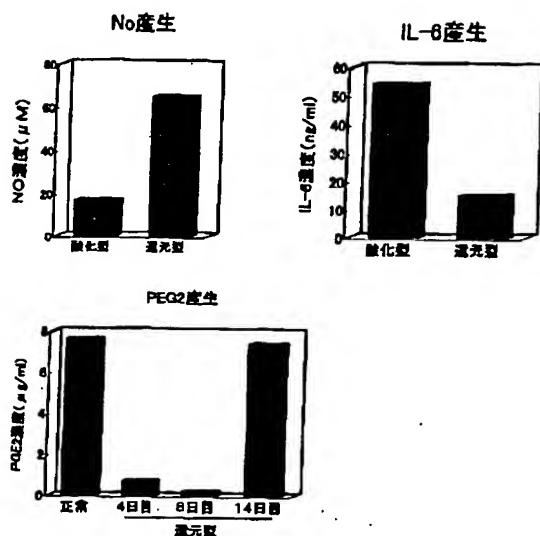
【図2】

### TH1/TH2 バランス と 還元/酸化型マクロファージ(Mφ)

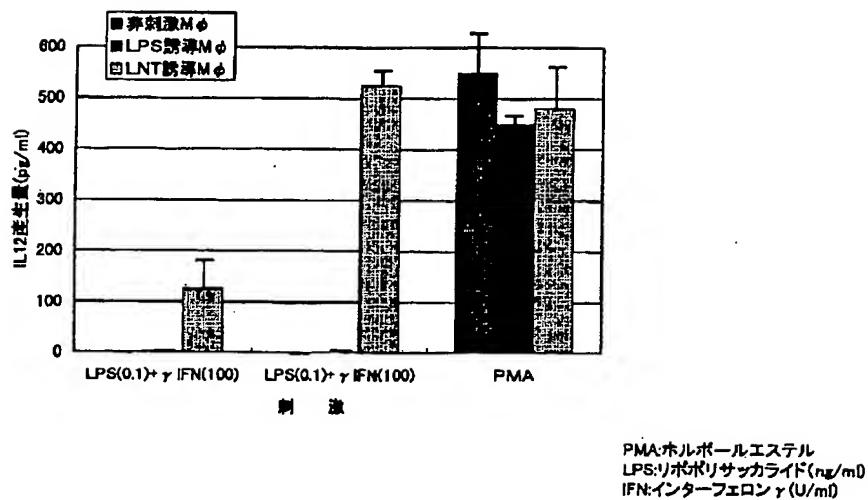


【図3】

酸化型／還元型マクロファージの機能



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
A 61 K 31/00識別記号  
611  
617  
629  
635  
637F I  
A 61 K 31/00611C  
617  
629  
635  
637D  
637E

	6 4 3		6 3 7 C
			6 4 3 D
31/02		31/02	
31/195	6 0 3	31/195	6 0 3
31/215		31/215	
31/35		31/35	
31/385		31/385	
31/66	6 0 1	31/66	6 0 1
31/715	6 0 1	31/715	6 0 1
38/00		37/02	